Jonatas William Silva

Análise do potencial uropatogênico de *Escherichia coli* enteroagregativa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Dr. Waldir Pereira Elias Junior

São Paulo

2019

RESUMO

SILVA, J. W. **Análise do potencial uropatogênico de *Escherichia coli* enteroagregativa.** 2019. 93 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) é um dos patótipos de *E. coli* que causam diarreia. EAEC também tem sido associada a casos de infecção do trato urinário (ITU) nos últimos anos. De fato, um subgrupo de cepas fecais de EAEC está inserido nos mesmos grupos filogenéticos de cepas de *E. coli* uropatogênicas (UPEC) carreando marcadores de EAEC, dessa forma apresentando correlação filogenética. Esses dados apontam para a possibilidade de que pelo menos um subgrupo de cepas de EAEC tenha potencial uropatogênico. Devido a esses fatos, o objetivo do presente estudo foi determinar as propriedades uropatogênicas de cepas de EAEC que possuem marcadores genéticos de *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC). Para esse fim foram selecionadas 33 EAEC apresentando marcadores genéticos de ExPEC (EAEC/ExPEC+), isto é, a presença de pelo menos dois dos genes *afa*/*dra*, *iutA*, *sfa*/*foc*, *kpsMTII* e *papA*/*papC*. Para fins comparativos também foram selecionadas 11 cepas de EAEC sem esses marcadores (EAEC/ExPEC-) e 18 cepas de UPEC. Inicialmente, todas as cepas foram testadas quanto à capacidade de aderência nas células da linhagem 5637 (bexiga humana) e HEK293 (rim embrionário humano). Os ensaios realizados com células de bexiga mostraram que 82% das cepas analisadas eram aderentes, 12% causaram destacamento celular e 6% não aderiram; enquanto os ensaios realizados com células renais mostraram que 88% eram aderentes e 12% causaram descolamento celular. Houve semelhança entre os perfis das linhagens EAEC/ExPEC+ e UPEC, onde o descolamento celular foi verificado. As cepas citodestacantes apresentaram atividade α-hemolítica detectada em ágar sangue de carneiro. A presença da fímbria tipo 1 foi investigada indiretamente pela aglutinação de *Saccharomyces cerevisiae*. A aglutinação foi detectada em 66,1% de todas as cepas e esse fenótipo foi inibido pela presença de D-manose a 2%, indicando a expressão da fímbria tipo 1 na maioria das cepas estudadas, sem diferenças entre os grupos de cepas. A produção de biofilme em poliestireno também foi avaliada na presença e ausência de 1% de metil α-D-manopiranósido (α-D-man) e observou-se que no grupo das EAEC/ExPEC+ a formação de biofilme foi detectada em 60,6% das cepas e esse fenótipo não foi inibido pelo α-D-man, sugerindo que outras adesinas, além da fímbria tipo 1, podem estar envolvidas na produção de biofilme por essas cepas. Um modelo de ITU ascendente com camundongos C57BL/6 foi realizado para investigar a capacidade uropatogênica das cepas. Todas as cepas EAEC/ExPEC+ avaliadas foram capazes de causar ITU nesse modelo, enquanto apenas uma cepa EAEC/ExPEC- causou ITU. Não houve associação entre a capacidade de causar ITU e os fatores de virulência de EAEC e UPEC pesquisados. Por fim, conclui-se que cepas fecais de EAEC com *background* genético contendo marcadores de ExPEC são capazes de colonizar o uroepitélio de forma mais eficiente e assim ocasionar cistite e pielonefrite em camundongos C57BL/6. Dessa forma, cepas de EAEC fecais que possuem essas combinações de genes apresentam potencial uropatogênico.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. Infecções bacterianas. Virulência. Infecções urinárias

ABSTRACT

SILVA, J. W. **Analysis of uropathogenic potential of enteroagregative *Escherichia coli***. 2019. 93 p. Master thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) is one of the *E. coli* pathotypes that cause diarrhea. In the last years, EAEC has also been associated with cases of urinary tract infection (UTI). In fact, a subgroup of fecal EAEC strains is inserted in the same phylogenetic groups of uropathogenic *E. coli* (UPEC) strains carrying EAEC markers, thus showing phylogenetic correlation. These data pointed out to the possibility that at least one subgroup of EAEC strains has uropathogenic potential. In view of these facts, the aim of the present study was to determine the uropathogenic properties of EAEC strains that have genetic markers of extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC). For this purpose, 33 EAEC with ExPEC genetic markers (EAEC/ExPEC+), that is, the presence of at least two of the genes *afa/dra*, *iutA*, *sfa/foc*, *kpsMTII* and *papA/papC*, were selected For comparative purposes, 11 EAEC strains without these markers (EAEC/ExPEC-) and 18 UPEC strains were also selected. Initially, all strains were tested for adherence in the 5637 (human bladder) and HEK293 (human embryonic kidney) cells. Assays performed with bladder cells showed that 82% of the strains analyzed were adherent, 12% caused cell detachment and 6% did not adhere; whereas renal cell assays showed that 88% were adherent and 12% caused cell detachment. There was similarity between EAEC/ExPEC+ and UPEC profiles, where cell detachment was verified. The strains that provoked cell detachment showed α-hemolytic activity, detected in sheep blood agar. The presence of type 1 fimbria was investigated indirectly by agglutination of *Saccharomyces cerevisiae*. Agglutination was detected in 66.1% of all strains and this phenotype was inhibited by the presence of 2% D-mannose, indicating the expression of type 1 fimbria in most of the studied strains, with no differences between the groups of strains. Biofilm production in polystyrene was also evaluated in the presence and absence of 1% methyl α-D-mannopyranoside (α-D-man). It was observed that in the EAEC/ExPEC+ group biofilm formation was detected in 60.6% of the strains and this phenotype was not inhibited by α-D-man, suggesting that adhesins other than type 1 fimbria may be involved in biofilm production by these strains. A model of ascending UTI with C57BL/6 mice was performed to investigate the uropathogenic capacity of the strains. All EAEC/ExPEC+ strains evaluated were able to cause UTI in this model; while only one EAEC/ExPEC- strain caused UTI. There was no association between the ability to cause UTI and the EAEC and UPEC virulence factors investigated. In conclusion, fecal EAEC strains with a genetic background containing ExPEC markers are able to colonize the uroepithelium more efficiently and, therefore, cause cystitis and pyelonephritis in C57BL/6 mice. Thus, fecal EAEC strains that harbor these gene combinations have uropathogenic potential.

Keywords: *Escherichia coli*. Bacterial infections. Virulence. Urinary infections.

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria pertencente à família Enterobacteriaceae, sendo assim um micro-organismo bacilar, Gram negativo, não esporulante, anaeróbio facultativo, que coloniza o trato intestinal de animais de sangue quente e de humanos, permanecendo como comensal durante toda a vida do indivíduo (JOHNSON; RUSSO, 2005; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004; SCHEUTZ; STROCKBINE, 2005; TENAILLON et al., 2010).

Embora a maioria das cepas de *E. coli* circulantes sejam comensais e não causem nenhum dano ao hospedeiro, com exceção de pacientes imunocomprometidos e/ou quando a barreira gastrointestinal é rompida, alguns clones de *E. coli* possuem fatores de virulência variados que lhes conferem a habilidade de colonizar novos sítios e causar um amplo espectro de doenças intestinais e extraintestinais. Estes fatores geralmente são codificados em elementos genéticos móveis como ilhas de patogenicidade, sequências de inserção ou plasmídeos, o que facilita a formação de novas combinações de fatores de virulência que podem vir a ser parte integrante do genoma bacteriano (CROXEN; FINLAY, 2010; GOMES et al., 2016; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Em *E. coli*, combinações de diferentes fatores de virulência persistiram entre as linhagens, levando ao reconhecimento de diferentes patótipos de *E. coli*. As infecções causadas pelos diferentes patótipos de *E. coli* podem resultar em três condições clínicas comuns: diarreia/disenteria, infecção do trato urinário (ITU) e sepse/meningite (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Ao estudar populações bacterianas utilizando-se *E. coli* como protótipo, Whittam, Ochman e Selander (1983) descreveram estruturas genéticas denominadas filogrupos, os mesmos eram divididos inicialmente em 4 grupos, sendo os mesmos A, B1, B2 e D. Com base nesses dados, Clermont et al. (2000) desenvolveram uma reação em cadeia de polimerase (PCR) para classificar filogeneticamente cepas de *E. coli,* sendo que por este método as cepas virulentas, principalmente cepas de *E. coli* extraintestinais, geralmente classificavam-se no filogrupo B2, podendo algumas

serem classificadas no filogrupo D, enquanto que cepas comensais e cepas de *E. coli* diarreiogênicas eram encontradas nos filogrupos A e B1 (HERZER et al., 1990; LECOINTRE et al., 1998; SABATÉ et al., 2006).

A técnica descrita por Clermont et al. (2000) foi aprimorada em estudos posteriores do mesmo grupo. Na nova abordagem as cepas podem ser classificadas em oito filogrupos conhecidos atualmente (filogrupos A, B1, B2, C, D, E, F e G). Com o uso desta técnica foi possível observar que cepas de ExPEC são mais comumente encontradas nos filogrupos B2, D e F e cepas de DEC e comensais são comumente encontradas nos filogrupos A, B1, C e E. Com o acúmulo de dados de genoma completo, ficou claro que algumas linhagens pertenciam a um grupo intermediário entre os grupos F e B2, dando origem assim o filogrupo G. Esta abordagem deixou claro que cepas de diversos filogrupos diferem em características fenotípicas e genotípicas, nicho ecológico e habilidade em causar doenças (ALM et al., 2011; CLERMONT et al., 2013; CLERMONT et al., 2019; TENAILLON et al., 2010).

1.2 *E. coli* como agente de infecções

De acordo com grupos de determinantes de virulência adquiridos, foram formadas combinações específicas definindo-se os grupos de *E. coli* que são coletivamente conhecidos como *E. coli* diarreiogênicas (DEC) e *E. coli* extraintestinais (ExPEC) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; RUSSO; JOHNSON, 2000).

E. coli diarreiogênicas, ou DEC, causam infecções intestinais por desregularem as funções normais do intestino, provocando assim a diarreia ou disenteria. Podem causar estes danos de diversas maneiras, de acordo com o seu arcabouço genético de fatores de virulência. Na diarreia induzida por bactérias ocorre a rápida perda de fluidos e eletrólitos, resultado da inibição da absorção normal do intestino, assim como a ativação de processos de secreção (BLASER; DEANE; FRUHWALD, 2015; INGERSON-MAHAD; REID, 2011; VISWANATHAN; HODGES; HECHT, 2008). Nos processos invasivos, os danos na mucosa intestinal induzem grande processo inflamatório com perda de sangue nas fezes, o que caracteriza a disenteria (GOMES et al., 2016).

A diarreia é considerada um problema de saúde pública em todo o mundo, sendo a causa estimada de 1,3 milhões de mortes por ano (GBD, 2017; WHO, 2018). É a segunda maior causa de mortalidade infantil no mundo. No ano de 2017 causou 424 mil mortes em crianças de até 5 anos (WHO, 2018). Em regiões onde as gastroenterites são endêmicas, como em países da África e do sudoeste asiático, 25% das mortes na infância são causadas por gastroenterites virais agudas (SIDOTI et al., 2015).

Devido à alta mortalidade causada pela diarreia, existem iniciativas governamentais estipuladas pela *United Nations Chidren´s* (UNICEF) e *World Health Organization* (WHO) para prevenir a doença, como por exemplo as políticas de combate à desnutrição crônica, à falta de saneamento básico e à falta de acesso à água potável (FISCHER et al., 2012).

Até o ano de 2011, 71,8% dos municípios brasileiros não possuíam uma política municipal de saneamento básico (IBGE, 2011). No ano de 2017, 41,5% dos 5.570 municípios brasileiros afirmaram possuir Plano Municipal de Saneamento Básico (IBGE, 2018). A situação do saneamento básico precário no país está melhorando a cada ano, porém nos municípios do Norte os números ainda são preocupantes, onde apenas 450 municípios dessa região apresentam um Plano Municipal de Saneamento Básico (IBGE, 2018), o que impacta no risco de casos de doenças gastrointestinais infecciosas.

Repetidas crises diarreicas em crianças contribuem significantemente para deficiências de crescimento e comprometem parte do condicionamento físico, cognição e escolaridade (GUERRANT et al., 2013). Estima-se que diarreias recorrentes nos primeiros dois anos de idade podem contribuir com a perda de 10 pontos no quociente de inteligência (Q.I.) e um ano de escolaridade até os nove anos de idade (KEUSCH et al., 2013; PETRI et al., 2008; WHO, 2015).

Em contraste com outros patógenos entéricos, como *Campylobacter* spp., *Shigella* spp. e *Salmonella* spp., o diagnóstico das cepas de DEC no curso da infecção é bastante complexo, isto porque grande parte das cepas causadoras de diarreia são bioquimicamente idênticas às *E. coli* comensais e a diferenciação necessita de infraestrutura laboratorial muito especializada (ESTRADA-GARCIA et al., 2014).

A diversidade patogênica de DEC compreende pelo menos seis categorias ou patótipos, os quais causam infecção intestinal de diferentes maneiras. Os patótipos de DEC diferem em relação aos seus locais preferenciais de colonização do hospedeiro, mecanismos de virulência, sintomas clínicos e consequências causadas. Os patótipos são classificados como *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e seu subgrupo *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) e *E. coli* enteroinvasora (EIEC) (GOMES et al., 2016; NATARO; KAPER, 1998).

Outro patótipo de DEC foi descrito como *E. coli* difusamente aderente (DAEC), o qual compreende cepas que aderem às células epiteliais cultivadas em uma distribuição característica, denominada adesão difusa. Apesar de sua classificação como um grupo distinto dos outros patótipos, a designação de DAEC como um diferente patótipo de DEC requer mais estudos epidemiológicos, que foram dificultados pela complexidade na sua identificação e classificação (CROXEN, et al., 2013). Diferentemente dos outros patótipos, onde cepas verdadeiramente patogênicas foram identificadas em surtos e/ou estudos em voluntários, a patogenicidade da categoria DAEC permanece questionável (GOMES et al., 2016; NATARO; KAPER, 1998).

E. coli enteropatogênica (EPEC) é um importante agente etiológico de diarreia infantil em muitos países em desenvolvimento, por conta de sua alta prevalência na comunidade e em ambientes hospitalares (OCHOA; CONTRERAS, 2011).

Originalmente identificadas pela determinação dos antígenos somático (O) e flagelar (H), técnica conhecida como sorotipagem, cepas de EPEC são agora definidas como *E. coli* com a capacidade de causar diarreia, produzir uma histopatologia no epitélio intestinal, conhecida como lesão *attaching-effacing* (lesão A/E), e pela incapacidade de produzir toxina Shiga (Stx) e enterotoxinas termolábil (LT) ou termoestável (ST) (GOMES et al., 2016; NATARO; KAPER, 1998).

Com a melhorias nas técnicas que permitem uma melhor compreensão do genoma e mecanismos e virulência entre as estirpes de EPEC ao longo dos anos tornou-se possível à subclassificação de EPEC em EPEC típica (tEPEC) e EPEC atípica (aEPEC) (HERNANDES et al., 2009; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). As cepas tEPEC causadoras de diarreia em

humanos possuem um grande plasmídeo de virulência conhecido como "*EPEC adherence factor plasmid"* (pEAF), que codifica a fímbria tipo IV chamada de "*bundle-forming pilus"* (BFP), enquanto aEPEC não possui este plasmídeo (KAPER, NATARO, MOBLEY, 2004).

As cepas de tEPEC caracterizam-se pelo padrão de adesão localizada (AL) na superfície de células HeLa ou HEp-2, apresentando-se como microcolônias compactas aderidas às células após três horas de contato. Já as cepas de aEPEC podem apresentar um padrão de aderência semelhante a tEPEC, porém com microcolônias mais frouxas, denominado adesão localizada-*like* (AL-L), o qual pode ser observado após seis horas de contato com as células epiteliais (RODRIGUES et al., 1996; SCALETSKY; SILVA; TRABULSI, 1984; SCALETSKY et al., 1999).

EHEC/STEC representam um grupo bem conhecido de patógenos de origem alimentar distribuídos mundialmente. A capacidade de produzir uma ou mais citotoxinas da família da toxina Shiga (Stx) constitui o principal atributo de virulência desse patógeno de *E. coli* (MELTON-CELSA, 2014). As doenças causadas por este patótipo continuam sendo um grande problema de saúde pública em todo o planeta. As manifestações clínicas da infecção por EHEC/STEC incluem a diarreia sanguinolenta, a colite hemorrágica e a síndrome hemolítica urêmica (SHU) (AMORIM et al., 2014; CROXEN et al., 2013).

Stx pode ser classificada em dois tipos: Stx1 e Stx2, incluindo subtipos e variantes dos subtipos (SCHEUTZ, 2014). Os sorogrupos mais relacionados a doenças são conhecidos como "*big six*" e compreendem os sorogrupos O26, O45, O103, O111, O121 e O145 (BROOKS et al., 2005).

O principal reservatório destas cepas é o trato intestinal de bovinos, e os surtos causados por elas foram inicialmente associados ao consumo de hambúrgueres malcozidos. As cepas do sorogrupo O157:H7 são as mais conhecidas, e foram responsáveis por um surto que teve origem em uma rede de lanchonete (CROXEN et al., 2013; INGERSON-MAHAD; REID, 2011; RILEY et al., 1983).

As cepas de ETEC são caracterizadas pela produção de fatores de colonização (CFs) e pelo menos uma das duas enterotoxinas: LT e ST. A ETEC representa uma das causas mais comuns de diarreia em crianças em países em desenvolvimento e

em viajantes para essas regiões endêmicas. ETEC também é a causa de prejuízos econômico para os agricultores e a indústria, onde é um importante patógeno para frangos, suínos e gado de corte (GOMES et al., 2016).

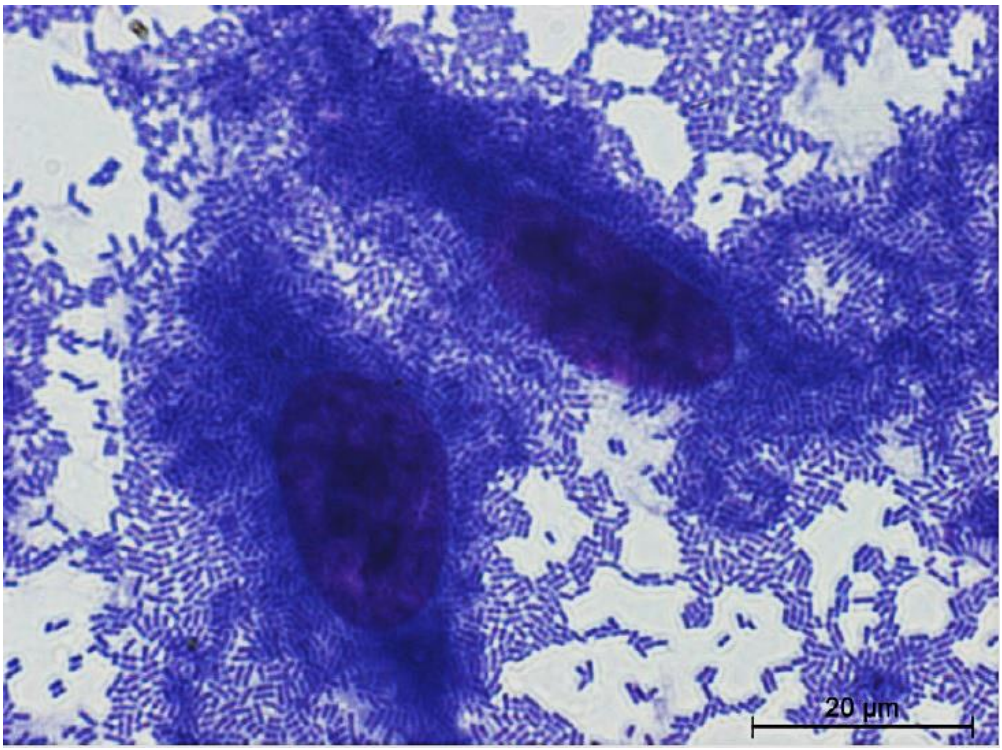
Logo após a aderência à mucosa intestinal, as cepas de ETEC produzem as enterotoxinas LT e ST. Ambos os tipos de toxinas medeiam a desregulação dos canais iônicos na membrana epitelial, levando à perda de íons e grandes quantidades de água, levando a diarreia aquosa característica causada por essas cepas bacterianas (FLECKENSTEIN et al., 2010).

Cepas de EIEC são bioquímica, genética e patogenicamente relacionadas a *Shigella spp*. Estas bactérias são taxonomicamente indistinguíveis no nível de espécie, mas, levando em conta a significância clínica de *Shigella*, a nomenclatura distinta foi mantida. Este patótipo é um patógeno intracelular facultativo e é o agente etiológico da disenteria bacilar (PUPO; LAN; REEVES, 2000; WEI et al., 2003).

EIEC apresenta virulência reduzida quando comparada a *Shigella*, incluindo expressão reduzida dos fatores de virulência, baixa eficiência ao destruir macrófagos, baixo índice de espalhamento célula-célula e baixa indução de resposta pró-inflamatória, o que leva a uma doença menos severa (BANDO et al., 2010; MORENO et al., 2009; MORENO et al*.,* 2012). A adaptação de EIEC para se tornar um patógeno intracelular deriva basicamente da aquisição de um plasmídeo de invasão, conhecido como pINV (CROXEN et al., 2013). As infecções por EIEC são pouco frequentes, mesmo em países subdesenvolvidos (KOTLOFF et al., 2013).

EAEC é definida como o patótipo de DEC que apresenta o padrão de adesão agregativo (AA) em células epiteliais cultivadas (NATARO et al*.*, 1987; NATARO; STEINER; GUERRANT, 1998). No padrão AA (Figura 1) as bactérias formam agregados que se assemelham a tijolos empilhados, aderindo à superfície das células eucarióticas, bem como à superfície da lamínula, em arranjos análogos a favos de colmeia (GOMES et al., 2016).

Figura 1- Padrão de adesão agregativo de EAEC



Reproduzido de Andrade, (2019).
Padrão AA em células HEp-2 após 6 h de incubação da cepa de EAEC BA732 evidenciado pela presença de bactérias agregadas e aderidas na superfície da lamínula e também das células. Coloração com May-Grünwald e Giemsa.

Esse padrão foi descrito durante a análise da aderência em células HEp-2 de cepas de *E. coli* isoladas em um estudo epidemiológico sobre a etiologia da diarreia aguda na infância, conduzido no Chile (NATARO et al., 1987). A alta prevalência do padrão AA em cepas de *E. coli* isoladas de crianças com diarreia, levou à proposição do novo patótipo de DEC, denominado *E. coli* enteroagregativa ou EAggEC (NATARO et al., 1987). Posteriormente a literatura da área adotou a abreviatura EAEC e EAggEc entrou em desuso (HEBBELSTRUP JENSEN, 2014; NATARO; KAPER, 1998).

Dentre os patótipos de *E. coli* diarreiogênica, EAEC se destaca por ser detectada em estudos epidemiológicos ao redor do mundo, apresentando-se como um dos principais enteropatógenos emergentes. Crianças e adultos que vivem em países em desenvolvimento assim como turistas que visitam países em desenvolvimento são susceptíveis a infecções por EAEC, as quais podem resultar em infecção persistente. Apesar de sua alta prevalência, a patogênese de EAEC ainda é pouco conhecida em comparação às outras categorias de *E. coli* diarreiogênicas

(HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011).

Vários surtos de gastroenterites causados por EAEC foram relatados em países de baixa e alta renda econômica, envolvendo um alto número de crianças ou adultos, cuja infecção foi associada ao consumo de alimentos contaminados. Surtos no Reino Unido (DALLMAN et al., 2014), Japão (ITOH et al., 1997) e Itália (SCAVIA et al., 2008) são exemplos que demonstram a relevância da infecção de EAEC nos países desenvolvidos. No Reino Unido, após um festival de comidas típicas foram reportados 413 casos de diarreia persistente. Em um dos surtos japoneses, 2.697 crianças em idade escolar foram afetadas após o consumo de lanches escolares (ITOH et al., 1997). Na Itália, os surtos foram transmitidos por queijo não pasteurizado (SCAVIA et al., 2008). A EAEC também foi responsável por surtos em países em desenvolvimento como o que ocorreu em Niš, Servia, onde 16 recém-nascidos e três crianças tiveram diarreia, febre e perda de peso (COBELJIC et al., 1996).

Uma cepa de *E. coli* (sorotipo O104:H4) causou um grande surto de diarreia sanguinolenta e síndrome hemolítica urêmica e em vários países da Europa em 2011, onde pôde ser observada uma rara combinação de características típicas de EAEC juntamente com a capacidade de produzir a toxina Stx, característica de STEC (SCHEUTZ et al., 2011). Essa cepa foi amplamente estudada e seu genoma mostrou que correspondia à cepa de EAEC O104:H4 (cepa 55989) que adquiriu o fago que codifica Stx e plasmídeos de virulência (NAVARRO-GARCIA, 2015).

O padrão AA demonstrado no teste de adesão em células HeLa ou HEp-2 é usado como diagnóstico padrão (*gold standard*) para a classificação de EAEC (NATARO; KAPER, 1998), uma vez que ainda não foi encontrado um determinante genético comum para todas cepas deste patótipo (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006). Nos últimos anos, diagnósticos moleculares têm sido desenvolvidos como alternativa ao ensaio de adesão, o qual é caro, consome tempo e requer cultura de células e infraestrutura adequada (ANDRADE; GOMES; ELIAS, 2014; ESTRADA-GARCIA; NAVARRO-GARCIA, 2012).

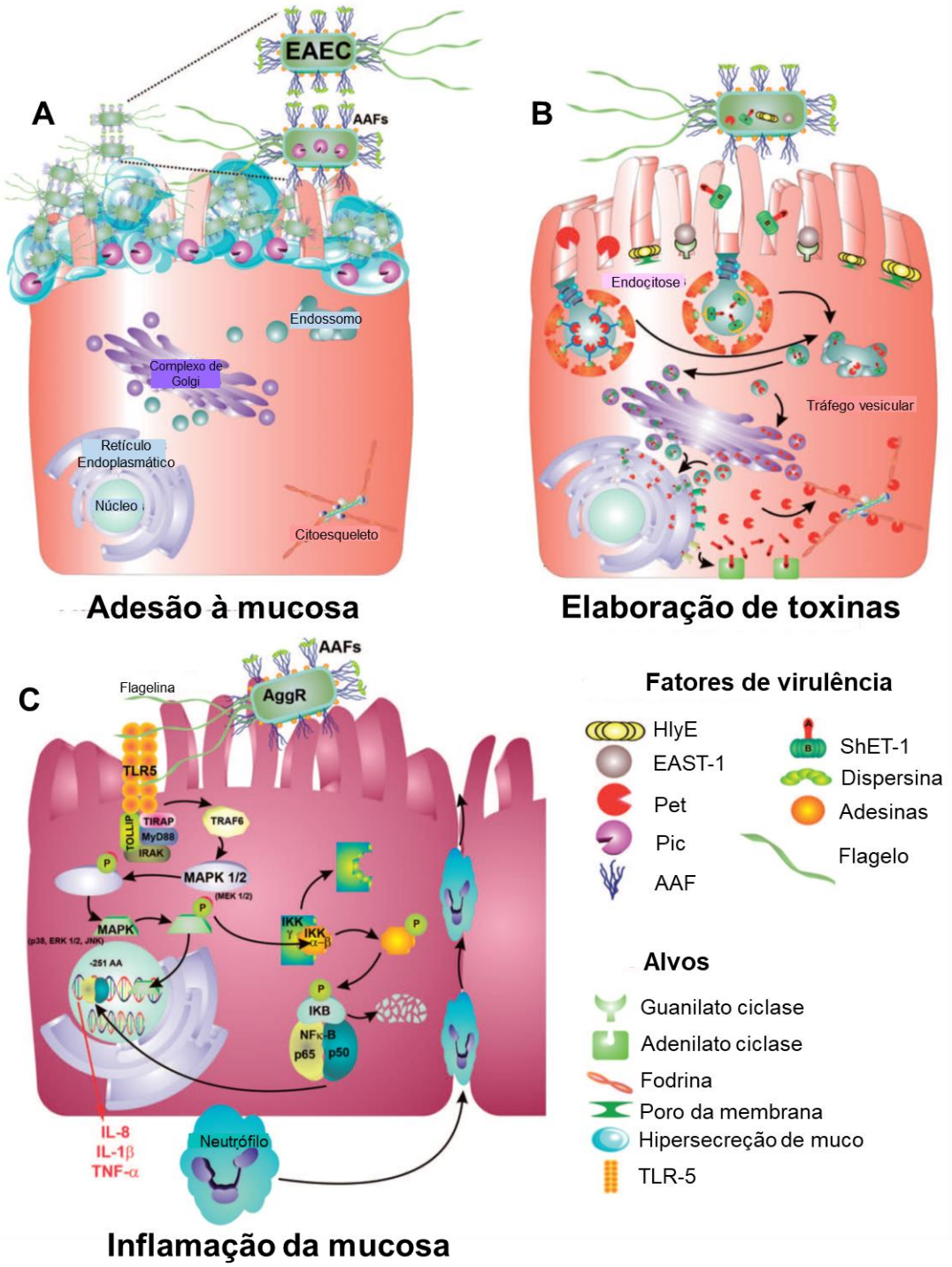
A estratégia básica de infecção por EAEC resume-se na colonização da mucosa intestinal seguida pela secreção de enterotoxinas e citotoxinas e indução de processo inflamatório (NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011). EAEC aumenta

significantemente a secreção de muco, envolvendo as bactérias em um biofilme, o que pode estar relacionado à habilidade de colonização e de promover diarreia persistente (NATARO; KAPER, 1998). A Figura 2 apresenta as etapas da patogênese de EAEC indicando os principais fatores de virulência envolvidos em cada etapa.

Sarantuya et al. (2004) propuseram a classificação de EAEC em grupos de típica e atípica, de acordo com a presença ou não do gene *aggR*, o qual codifica uma proteína reguladora global dos genes de virulência de EAEC e está localizado no plasmídeo de virulência comumente presente em cepas deste patótipo (BAUDRY et al., 1990).

A cepa EAEC 042, que causou diarreia em um estudo em voluntários (NATARO et al. 1995), tornou-se a cepa EAEC protótipo para o estudo dos fatores de virulência e patogenicidade da EAEC. A 042 alberga um plasmídeo de ~100 kb denominado pAA2 (CZECZULIN et al., 1999). Nesse plasmídeo estão presentes diversos genes de virulência que têm a expressão regulada por AggR (CHAUDHURI et al., 2010; ELIAS et al., 1999; NAVARRO-GARCIA et al., 2010). Os primeiros fatores de virulência a serem identificados em EAEC foram as fímbrias de adesão agregativa ou AAFs, seguidas por uma ampla gama de fatores funcionalmente distintos, incluindo as toxinas plasmideais Pet e EAST-1; a toxina ShET1 codificada cromossomicamente; Pic, uma mucinase amplamente associada a *E. coli* patogênica e *Shigella sp*.; uma proteína secretada chamada dispersina, que se liga ao LPS neutralizando assim a carga negativa da célula; e mais recentemente a um novo sistema de secreção do tipo VI (DUDLEY et al. 2006; ESLAVA et al*.,* 1998; HARRINGTON et al*.* 2005; HENDERSON et al*.,* 1999, NATARO et al*.,* 1995; SHEIK et al*.,* 2002; WANKE et al*.*, 1998).

Figura 2- Esquema da patogênese de EAEC evidenciando os fatores de virulência identificados principalmente em EAEC 042



Adaptado de Navarro-Garcia e Elias (2011).

Modelo de 3 estágios para a infecção por EAEC na mucosa intestinal. (A) No primeiro estágio ocorre a aderência da bactéria à mucosa do hospedeiro com participação das fímbrias AAF (linhas azuis), dispersina (pequenas esferas verdes) e proteína Pic (esfera rosa), uma proteína que degrada muco.

(B) No segundo estágio ocorre a elaboração de toxinas que agem principalmente no citoesqueleto da célula, como as toxinas Pet (esfera vermelha), EAST-1 (esfera cinza), ShET-1 (complexo A-B verde e vermelho) e enterohemolisina (esferas amarelas). (C) No terceiro estágio ocorre a indução da resposta inflamatória, mediada pela flagelina (linhas verdes), fímbrias AAF e outras estruturas não conhecidas.

Cinco variantes da fímbria AAF foram descritas até agora: AAF/I, II, III, IV e V; sendo todas elas reguladas pelo ativador transcricional AggR. Estas fímbrias são relacionadas às adesinas da família Dr, as quais requerem proteínas chaperonas e *usher* para sua biogênese. Além disto, as fímbrias da família Dr estão relacionadas também a cepas de UPEC, que comumente expressam adesinas Afa (CROXEN; FINLAY, 2010; JØNSSON et al., 2015; NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011).

A mais nova variante, AAF/V, foi descoberta recentemente e revelou-se como uma variante quimérica de AAF/III, na qual todos os genes acessórios (*agg3CD*), bem como o gene da subunidade pilina (*agg3B*) são compartilhados, exceto pelo gene da subunidade unidade principal da pilina que é substituído por *agg5A* (JØNSSON et al*.,* 2015).

Outra característica de EAEC é a habilidade de formar biofilme em superfícies bióticas e abióticas, resultado da agregação bacteriana (SHEIK et al., 2001). A formação de biofilme pode ser um importante fator contribuinte na infecção persistente, ao permitir que as bactérias evadam o sistema imunológico local e impedindo o transporte de fatores antibacterianos, incluindo antibióticos (PEREIRA, et al*.,* 2007; TOKUDA et al*.,* 2010). Em vários estudos, a expressão de AAF mostrou-se essencial para a formação de biofilme por EAEC (BOISEN, et al., 2008; BOLL et al*.,* 2013; FARFAN; INMAN; NATARO, 2008; SHAMIR et al*.*, 2010; SHEIK et al*.,* 2001).

Uma importante classe de toxinas produzidas por EAEC são as chamadas proteínas autotransportadoras. As proteínas autotransportadoras são proteínas de membrana externa que consistem de um amplo domínio N-terminal extracelular (domínio passageiro) e um domínio C-terminal que consiste em um domínio β-barril (domínio β). Este domínio foi originalmente proposto com a função de um canal de transporte para seu próprio domínio passageiro pela membrana externa (BERNSTEIN, 2007; HENDERSON et al., 2004). Inicialmente duas proteínas autotransportadoras foram identificadas em EAEC, Pet e Pic (ESLAVA et al., 1998;

HENDERSON et al., 1999), as quais fazem parte do grupo das SPATE, ou *serine protease autotransporters of* Enterobacteriaceae (DAUTIN, 2010). As SPATE compreendem serino proteases com funções diversas, tais como proteases, toxinas e adesinas (RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014).

A família das SPATEs inclui mais de 25 proteínas e são divididas filogeneticamente em duas classes, com base na sequência de aminoácidos do domínio passageiro. A classe-1 alberga as proteínas com efeito citotóxico (AL-HASANI et al., 2000; AL-HASANI et al., 2009; DJAFARI et al., 1997; ESLAVA et al., 1998; HENDERSON et al., 1999; MARONCLE et al., 2006; MELLIES et al., 2001; TADDEI et al., 2005), enquanto a classe-2 inclui as proteínas imunomoduladoras, que além de modularem o sistema imune, desempenham funções como a degradação de mucina, moléculas do sistema complemento e de glicoproteínas de superfície de leucócitos (ABREU et al., 2015; ; DUTTA et al., 2002; GUTIÉRREZ-JIMÉNEZ; ARCINIEGA; NAVARRO-GARCIA, 2008; HARRINGTON et al., 2009; LEYTON et al., 2003; PARHAM, et al., 2004; RUIZ-PEREZ et al., 2011).

Dentre as proteínas de classe-1 que são frequentemente encontradas em cepas de EAEC estão as proteínas Sat (GUYER et al., 2000), Pet (ESLAVA et al., 1998) e SigA (AL-HASANI et al, 2000). As de classe-2 frequentemente encontradas em EAEC são Pic (HENDERSON et al., 1999) e SepA (BENJELLOUN-TOUIMI et al., 1998; BOISEN et al., 2012).

As principais infecções extraintestinais causadas por *E. coli* são as infecções do trato urinário (ITU), as sepses (frequentemente associadas à infecção urinária) e as meningites de recém-nascidos. As cepas causadoras destas doenças são coletivamente denominadas ExPEC (JOHNSON; RUSSO, 2005; PITOUT, 2012; RILEY, 2014).

Embora existam muitos estudos nessa área específica, o mecanismo de disseminação clonal de cepas ExPEC não está totalmente esclarecido (RILEY, 2014). Os fatores de virulência conhecidos em ExPEC são associados principalmente à colonização e capacidade de sobreviver no ambiente. Os genes que codificam esses fatores de virulência são localizados no cromossomo bacteriano, onde usualmente encontram-se em ilhas de patogenicidade, ou em plasmídeos e são separados em cinco grupos principais: adesinas, toxinas, sistemas de aquisição de ferro, produção

de cápsula e invasinas (DALE; WOODFORD, 2015). Os principais fatores de virulência encontrados neste grupo bacteriano são mostrados na Figura 3.

Uma das adesinas mais estudadas tanto em DEC como em UPEC é a fímbria tipo 1. Estudos tem demonstrado que essa adesina é um fator de virulência indispensável em UPEC, embora a ampla distribuição desse pili não esteja restrita somente a cepas patogênicas (NORINDER et al., 2012; VEJBORG et al, 2011).

A fímbria tipo 1 é necessária para colonizar o trato urinário em camundongos e humanos (BAHRANI-MOUGEOT et al., 2002; CONNELL et al.,1996), mas por si só não é suficiente para estabelecer uma infecção a longo prazo (MULVEY; SCHILLING; HULTGREN, 2001). A extremidade adesiva desta fímbria, FimH, liga-se a proteínas α-D-manosiladas, tais como as uroplaquinas (UPs), que são expressas pelo uroepitélio e, portanto, essa adesina está mais relacionada ao trato urinário baixo. Devido à sua afinidade de ligação, a adesão ou agregação mediada por FimH de células eucarióticas (leveduras ou glóbulos vermelhos) é inibida pela manose (LÜTHJE; BRAUNER, 2014).

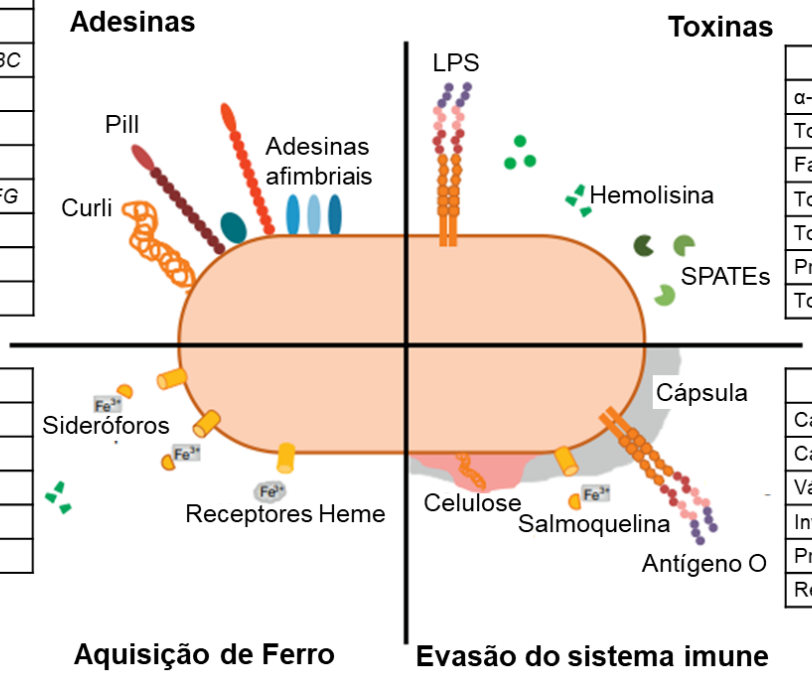
As ITU apresentam alta morbidade, tanto na comunidade como no ambiente hospitalar, resultando em altos custos econômicos e diminuição da produtividade de trabalho (BRUMBAUGH; MOBLEY, 2012). A grande maioria das ITU (70 a 90%) é causada por *E. coli* uropatogênica (UPEC), a qual reside no trato intestinal em conjunto com as cepas de *E. coli* comensais e patogênicas e ascende à bexiga através da uretra, sendo que por esta via estas cepas também são capazes de causar sepse.

As ITU são mais comuns em mulheres do que em homens por características anatômicas do trato geniturinário feminino e da presença de substâncias antibacterianas no fluido prostático masculino (FIHN, 2003). Não obstante, a maior ocorrência em mulheres se dá por conta da maior proximidade do canal uretral com o ânus e pelo canal da uretra ser menor em relação ao canal uretral masculino (WANG et al., 2013).

Figura 3- Principais fatores de virulência de ExPEC

Adesinas	Gene (s)
Sideróforo de adesão	*iha*
Adesina da família Dr	*afaA/draBC*
Pilus comum de *E. coli*	*ecpA*
Fímbria F1C	*foc*
Fímbria M	*bmaE*
Fímbria P	*papACEFG*
Fímbria S	*sfa/sfaS*
Hemaglutinina termo sensível	*tsh*
Fímbria tipo 1	*fimH*

Aquisição de Ferro	Gene (s)
Receptor de aerobactina	*iutA*
Proteína periplasmática de ligação ao Ferro	*sitA*
Receptor Salmoquelina	*iroN*
Receptor sideróforo	*ireA*
Receptor yersiniabactina	*fyuA*



Toxinas	Gene (s)
α-hemolisina	*hlyA*
Toxina citoletal distensora	*cdtB*
Fator citotóxico necrosante	*cnf1*
Toxina de *E. coli* enteroagregativa	*astA*
Toxina autotransportadora secretada	*sat*
Proteína envolvida em colonização	*pic*
Toxina vacuolizante	*vat*

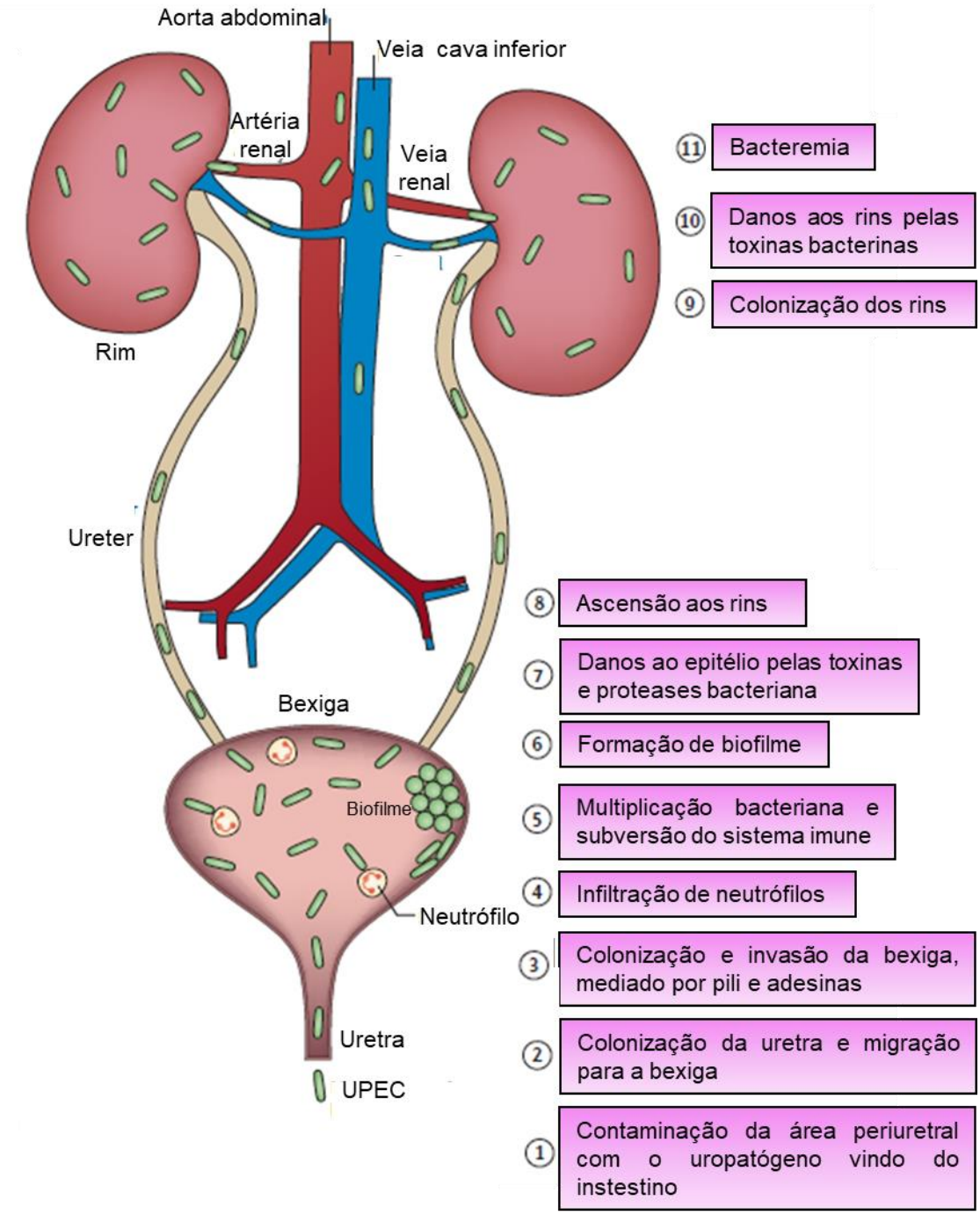
Evasão do sistema imune	Gene (s)
Cápsula do grupo 2	*kpsMTII*
Cápsula do grupo 3	*kpsMTIII*
Váriantes K1/K2/K5 do grupo de cápsula 2	K1,K2,K5
Invasão do endotélio cerebral	*ibaA*
Proteína de conjugação	*traT*
Resistência ao soro	*iss*

Adaptado de Dale e Woodford, (2015); Lüthje e Brauner, (2014).

As ITU podem ser classificadas em alta ou baixa. A ITU baixa começa com a colonização bacteriana na área periuretral pela contaminação fecal do trato gastrintestinal, seguida pela ascensão de bactérias através da uretra para a bexiga. Primeiramente ocorre adesão às células uroepiteliais por contas de adesinas, como por exemplo a fímbria tipo 1, seguida por apoptose e exfoliação das células epiteliais levando a um influxo de leucócitos polimorfonucleares, causando assim a cistite (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

A cistite não resolvida pode progredir para uma ITU alta, denominada pielonefrite, quando as bactérias sobem pelos ureteres e entram em um ou ambos os rins (MOBLEY; DONNENBERG; HAGAN, 2009). Neste estágio ocorre a vacuolização das células do epitélio renal e os danos aos glomérulos por conta da ação da toxina Sat. A pielonefrite, em alguns casos, evolui para bacteremia. Neste estágio o tratamento da doença é imprescindível, pois a partir da infecção renal as bactérias podem alcançar o sistema venoso e causar a sepse (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Assim, durante o curso de uma infecção, um uropatógeno bem-sucedido deve navegar em nichos dramaticamente diferentes, incluindo o trato gastrointestinal, a área periuretral, a uretra, a bexiga, o ureter, o rim e a corrente sanguínea (FORSYTH et al., 2018). As principais etapas da patogênese das infecções do trato urinário podem ser observadas na Figura 4.

Figura 4- Esquema dos estágios da infecção do trato urinário por UPEC



Adaptado de Flores-Mireles et al. (2015).

As cepas de *E. coli* que são capazes de ocasionar sepse estão também relacionadas às meningites neonatais. Estas cepas são também conhecidas como NMEC e são fatais entre 15-40% dos casos ou causam danos neurológicos severos

na maioria dos sobreviventes (DAWSON; EMERSON; BURNS, 1999; UNHANAND et al., 1993).

1.3 EAEC como agente de infecções do trato urinário

Conforme mencionado anteriormente, EAEC é um patógeno entérico identificado em todo o mundo e associado à diarreia aguda e persistente em crianças e adultos, caracterizada pela produção do padrão AA quando em contato com a mucosa intestinal ou células epiteliais cultivadas (HEBBELTRUP JENSEN et al. 2014; NATARO et al. 1987). Nos últimos anos, EAEC tem sido também associada a casos de ITU.

O grupo da Profa. Tânia A. T. Gomes (Disciplina de Microbiologia, Escola Paulista de Medicina, UNIFESP), iniciou na década de 1990 um estudo sobre a caracterização de cepas de UPEC isoladas de diferentes faixas etárias e de ambos os sexos, buscando características fenotípicas e genotípicas de EAEC (FALSETTI, 1998). Esse estudo foi posteriormente ampliado para a pesquisa de marcadores de virulência dos outros patótipos de DEC, tais como EPEC, DAEC e EHEC. Foi possível evidenciar nessa coleção de 225 UPEC a presença de alguns marcadores de DEC, com destaque a um grupo com características de EAEC, ou seja, reatividade com a sonda para o gene *aatA* e/ou a produção do padrão AA em células HeLa (ABE et al., 2008; FALSETTI, 1998). Esses achados indicaram que algumas cepas de EAEC poderiam ter potencial uropatogênico.

Posteriormente um importante relato de Olesen et al. (2012) descreveu um clone multirresistente de *E. coli* (O78:H10) classificada como EAEC, responsável por de um surto de ITU de origem comunitária em Copenhague (Dinamarca), demonstrando pela primeira vez a associação entre EAEC e um surto de doença extraintestinal. Outros estudos também têm demostrado a presença de genes de virulência de DEC/EAEC em cepas causadoras de ITU (HERZOG et al., 2014; KHAIRY et al., 2019; LARA et al., 2017; NAZEMI et al., 2011); bem como características uropatogênicas entre EAEC isoladas de fezes (REGUA-MANGIA et al., 2010; WALLACE-GADSDENF et al., 2007).

Em continuidade ao estudo de Olesen et al. (2012), esse mesmo grupo buscou determinar as propriedades uropatogênicas das cepas do surto de Copenhague e se essas propriedades eram conferidas por fatores de virulência específicos de EAEC (BOLL et al., 2013). Os autores demostraram que através da expressão de fímbrias de adesão agregativa I (AAF/I), as cepas do surto demonstraram pronunciadamente o aumento da aderência às células epiteliais da bexiga humana, quando comparadas aos protótipos de cepas uropatogênicas. Além do mais, as cepas foram virulentas em um modelo murino de ITU e as mesmas foram capazes de produzir biofilmes distintos em superfícies abióticas, incluindo cateteres urinários. Esses achados sugeriram que tais fatores de virulência específicos de EAEC aumentam a uropatogenicidade e podem ter desempenhado um papel significante na capacidade de as cepas causarem o surto adquirido pela comunidade dinamarquesa.

Recentemente o nosso grupo realizou um estudo pesquisando a presença de marcadores genéticos de ExPEC em cepas de EAEC isoladas de fezes, tanto de casos de diarreia como de controles assintomáticos (NUNES et al., 2017). O objetivo deste estudo foi analisar as relações filogenéticas entre cepas de EAEC que apresentavam marcadores genéticos de ExPEC e cepas de UPEC com e sem marcadores genéticos de EAEC. Noventa e duas cepas de EAEC foram analisadas quanto à presença dos genes considerados como marcadores de ExPEC, conforme proposto por Johnson et al. (2003), ou seja, *papA* e/ou *papC*, *sfa*/*foc*, *afa*/*dra*, *iutA* e *kpsMT* II. Através deste critério, uma cepa de *E. coli* é classificada como ExPEC se apresentar pelo menos dois desses genes em quaisquer combinações, sendo que *papA* e *papC* quando em conjunto são considerados como um único marcador. Nessa classificação, dentre as 92 EAEC estudadas foram detectadas 33 cepas com esse perfil de ExPEC. Estas 33 cepas foram selecionadas para análises de filogrupos e *multilocus sequence type* (MLST) junto a 18 cepas de UPEC vindas do estudo de Abe et al. (2008). Foi então gerado um filograma com os dados das sequências dos genes *housekeeping* do MLST (Figura 5).

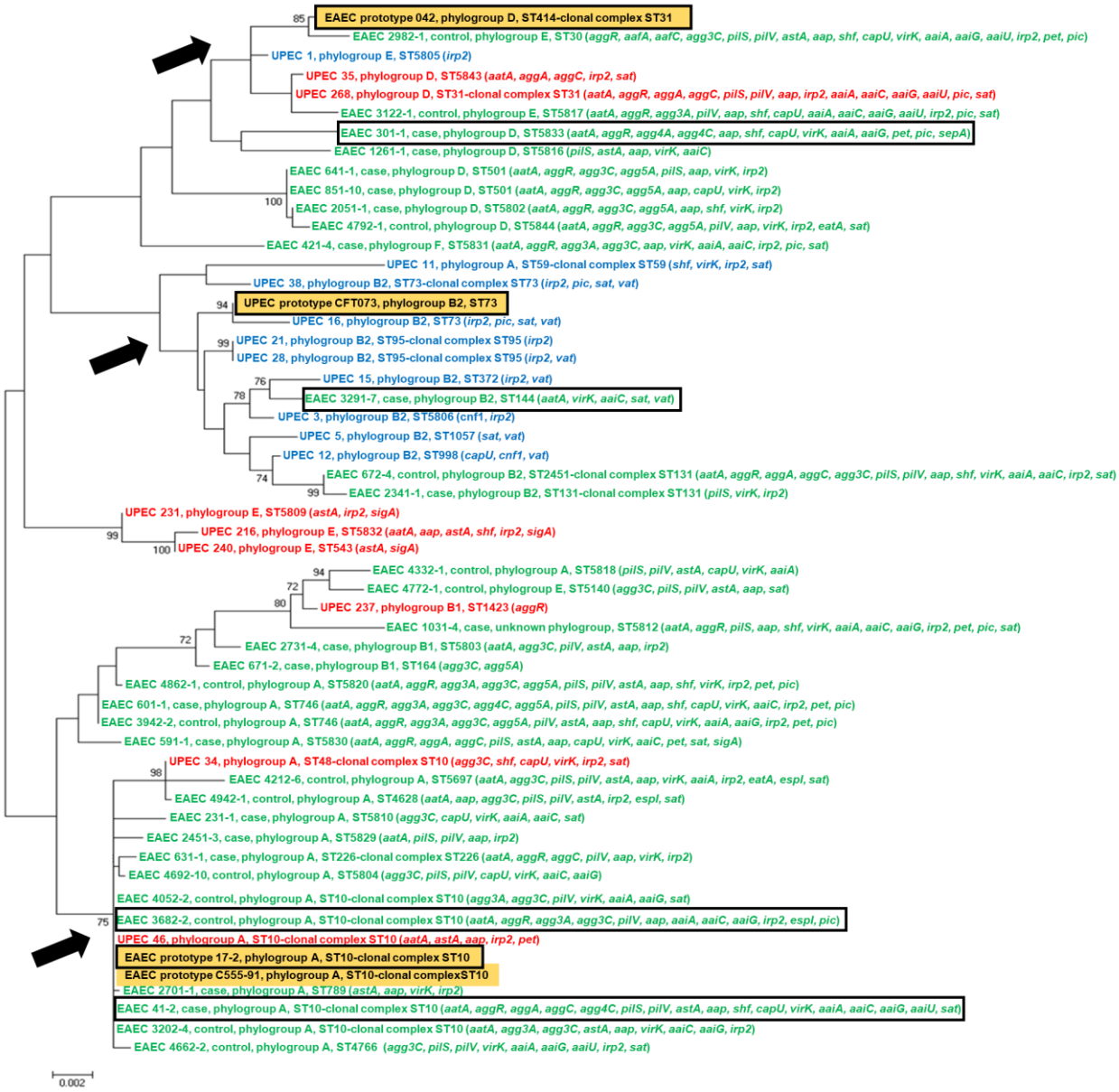
A árvore filogenética mostrou o grupamento das cepas de EAEC com marcadores de ExPEC (EAEC/ExPEC+) em três grupos principais: um primeiro relacionado à cepa diarreiogênica protótipo de EAEC (cepa 042); um segundo relacionado ao protótipo de UPEC (cepa CFT073); e um terceiro relacionado à cepa

de EAEC uropatogênica 078:H10 (clone que causou o surto de ITU na Dinamarca) juntamente à cepa 17-2 protótipo de EAEC isolada de diarreia, mas que apresenta marcas genéticas de UPEC.

É interessante notar que o terceiro grupo foi constituído por cepas fecais isoladas de casos de diarreia e controles saudáveis, todos do filogrupo A e a maioria pertencente ao *sequence type* (ST) 10; juntamente às cepas de EAEC 17-2 e C555-91 (sorotipo O78:H10). Vale ressaltar que a cepa C555-91 também foi isolada das fezes de um paciente com diarreia (BOLL et al., 2013). Além disso, a cepa EAEC 17-2, isolada de uma criança com diarreia aguda no Chile (NATARO et al., 1987) e protótipo da fímbria AAF/I, produz α-hemolisina e provoca destacamento celular de células HeLa em cultura, características de UPEC (GOMES et al., 1995).

Esses dados sugerem que cepas de EAEC podem apresentar potencial uropatogênico, tanto no curso de uma infecção diarreica, quanto em carreadores assintomáticos.

Figura 5- Filograma e características genéticas de cepas EAEC com marcadores de ExPEC e UPEC com e sem marcadores de EAEC



Adaptado de Nunes et al. (2017).

Filograma construído através do método *maximum likelihood* utilizando *bootstrap* com 1.000 réplicas. Em preto e destacado são as cepas protótipo, em verde são cepas EAEC classificadas como ExPEC, em azul são cepas UPEC sem a presença de marcadores de EAEC e em vermelho são cepas UPEC com marcadores de EAEC. As setas pretas evidenciam os três principais grupamentos: o *cluster* relacionado à EAEC 042; o *cluster* relacionado à UPEC CFT073; e o *cluster* relacionado às EAEC 078:H10 e 17-2. As cepas selecionadas para o experimento de ITU em modelo murino estão destacadas pelas barras pretas. Os dados referentes à presença de *agg5A* (pilina da fímbria AAF/V) e *cnf1* foram obtidos no presente estudo.

Tendo por base as características descritas anteriormente acerca de EAEC causadora de ITU, aliado aos dados relatando um subgrupo de EAEC colonizando o intestino e carreando marcadores genéticos de ExPEC, o presente estudo teve foco nas propriedades uropatogênicas de cepas EAEC isoladas de fezes de crianças com diarreia e de controles assintomáticos.

6 CONCLUSÕES

- ✓ Cepas fecais de EAEC isoladas de casos ou controles apresentam potencial uropatogênico, pois são capazes de:
  - aderir em células humanas cultivadas de bexiga e rins,
  - formar biofilme com envolvimento ou não da fímbria tipo 1,
  - causar cistite e pielonefrite no modelo de infecção ascendente do trato urinário de camundongos C57BL/6;
- ✓ Cepas EAEC com marcadores genéticos de ExPEC são capazes de causar ITU mais eficientemente do que cepas que não possuem tais marcadores;
- ✓ A presença desse subgrupo de EAEC nos intestinos, tanto no curso de uma doença diarreica quanto em carreadores assintomáticos, pode representar um potencial risco para a ITU.

REFERÊNCIAS*

ABE, C.M. et al. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrheagenic *E. coli*. **Immunol. Med. Microbiol.**, v. 52, p. 397-406, 2008.

ABREU, A.G. et al. The serine protease Pic from enteroaggregative *Escherichia coli* mediates immune evasion by the direct cleavage of complement proteins. **J. Infect. Dis.**, v. 212, n. 1, p. 106-115, 2015.

AL-HASANI, K. et al. Genetic organization of the *she* pathogenicity island in *Shigella flexneri* 2a. **Microb. Pathog.**, v. 30 p. 1-8, 2000.

AL-HASANI, K. et al. The immunogenic SigA enterotoxin *Shigella flexneri* 2a binds HEp-2 cells and induces fodrin redistribution in intoxicated epithelial cells. **PLoS One**, v. 4, p. 1-5, 2009.

ALM, E. W.; WALK, S. T.; GORDON, D. M. The niche of *Escherichia coli* in population genetics of bacteria. ASM Press. p. 107–123, 2011.

AMORIM, J. H. et al. Role of bacteriophages in STEC infections: new implications for the design of prophylactic and treatment approaches. **F1000 Res.,** v. 3, p. 74-82, 2014.

ANDRADE, F.B. **Interação da Serino Protease SepA de *Escherichia coli* enteroagregativa com células epiteliais *in vitro***. Tese (Doutorado em Microbiologia)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

ANDRADE, F.B.; GOMES, T.A.T.; ELIAS, W.P. A sensitive and specific molecular tool for detection of both typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Microbiol. Methods**., v. 106, p.16-18., 2014.

ARONSON, M. et al. Prevention of colonization of the urinary tract of mice with *Escherichia coli* by blocking of bacterial adherence with methyl α-D-mannopyranoside. **J. Infect. Dis.**, v. 139, p. 329-332, 1979.

ARTHUR, M. et al. Molecular epidemiology of adhesin and hemolysin virulence factors among uropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 57, n. 2, p. 303-313, 1989.

BAHRANI-MOUGEOT, F.K. et al. Type 1 fimbriae and extracellular polysaccharides are preeminent uropathogenic *Escherichia coli* virulence determinants in the murine urinary tract. **Molec. Microbiol.**, v. 45, n. 4, p. 1079-1093, 2002.

---

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2018.

BANDO, S.Y. et al. Expression of bacterial virulence factors and cytokines during in vitro macrophage infection by enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: a comparative study. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz,** v. 105, p. 786-91, 2010.

BANERJEE, R. et al. The clonal distribution and diversity of extraintestinal *Escherichia coli* isolates vary according to patient characteristics. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 57, p. 5912-5917, 2013.

BAUDRY, B. et al. A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. **J. Infect. Dis.**, v. 161, p. 1249-1251, 1990.

BELOIN, C.; ROUX, A.; GHIGO, J. M. *Escherichia coli* biofilms. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 322, p. 249–289, 2008.

BENJELLOUN-TOUIMI, Z. et al**.** SepA, the 110 kDa protein secreted by *Shigella flexneri*: two-domain structure and proteolytic activity. **Microbiol. ,** v. 144, p. 1815-1822, 1998.

BENZ, R. et al. Haemolysin of *Escherichia coli*: comparison of pore-forming properties between chromosome and plasmid-encoded haemolysins. **FEMS Microbiol. Immun.**, v. 5, n. 1-3, p. 55-62, 1992.

BERNIER, C.; GOUNON, P.; LE BOUGUÉNEC, C.. Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 8, p. 4302-4311, 2002.

BERNSTEIN, H. D. Are bacterial 'autotransporters' really transporters? **Trends Microbiol.**, v. 15, p. 441-447, 2007.

BEUTIN, L. The different hemolysin of *Escherichia coli*. **Med. Microbiol. Immunol**. v.180, p.167-182, 1991.

BHAKDI, S.; MARTIN, E. Superoxide generation by human neutrophils induced by low doses of *Escherichia coli* hemolysin. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 9, p. 2955-2962, 1991.

BOISEN, N. et al. Genomic characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Mali. **J. Infect. Dis.**, v. 205, n. 3, p. 431-444, 2012.

BLASER, A. R.; DEANE, A. M.; FRUHWALD, S. Diarrhoea in the critically ill. **Curr.Opin. Crit. Care**., v. 21, p., 142–153, 2015.

BLUM, G. et al. Gene clusters encoding the cytotoxic necrotizing factor type 1, Prs-fimbriae and α-hemolysin form the pathogenicity island II of the uropathogenic *Escherichia coli* strain J96. **FEMS Microbiology Letters**, v. 126, n. 2, p. 189-195, 1995.

BLUMER, C. et al. Regulation of type 1 fimbriae synthesis and biofilm formation by the transcriptional regulator LrhA of *Escherichia coli*. **Microbiol.**, v. 151, p. 3287-3298, 2005.

BOISEN, N. et al. New adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. **Infect. Immun.**, v. 76, p. 3281-3292, 2008.

BOISEN, N. et al. High prevalence of serine protease autotransporter cytotoxins among strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 80, n. 2, p. 294-301, 2009.

BOLL, E. J. et al. Role of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in uropathogenesis. **Infect. Immun.,** v. 81, p. 1164-1171, 2013.

BRAUN, V.; FOCARETA, T. Pore-forming bacterial protein hemolysins (cytolysins). **Critic. Rev. Microbiol.**, v. 18, n. 2, p. 115-158, 1991.

BROOKS, J. T. et al. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. **J. Infect. Dis.,** v. 192, p. 1422–1429, 2005.

BRUMBAUGH, A. R.; MOBLEY, H. L. Preventing urinary tract infection: progress toward an effective *Escherichia coli* vaccine. **Expert. Rev. Vaccines**., v. 11, p. 663-676, 2012.

BUERIS, V. et al. Detection of *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 839-844, 2007.

CHAHALES, P.; THANASSI, D.G. Structure, function, and assembly of adhesive organelles by uropathogenic bacteria. **Microbiol. Spect.**, v. 3, n. 5, 2015.

CHATTAWAY, M.A. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* have evolved independently as distinct complexes within the *E. coli* population with varying ability to cause disease. **PLoS One.**, v. 9, p. 11, 2014.

CHAUDHURI, R. R. et al. Complete genome sequence and comparative metabolic profiling of the prototypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain 042. **PLoS One**, v. 5, e8801, 2010.

CHIACCHIO, Gioia-Di et al. Novel hybrid of typical enteropathogenic *Escherichia coli* and Shiga-Toxin-producing *E. coli* (tEPEC/STEC) emerging from pet birds. **Front. Microbiol.**, v. 9, p. 2975, 2018.

CLERMONT, O. et al. Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. **Environ. Microbiol.**, 2019.

CLERMONT, O. et al. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Env. Microbiol. Rep.,** v. 5, p. 58-65, 2013.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. **Appl. Environ. Microbiol.,** v. 66, p. 4555–4558, 2000.

COBELJIĆ, M. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with an outbreak of diarrhoea in a neonatal nursery ward. **Epidemiol. Infect.,** v. 117, p. 11-16, 1996.

COMERY, R. et al. Identification of potentially diarrheagenic atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains present in Canadian food animals at

slaughter and in retail meats. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 79, n. 12, p. 3892-3896, 2013.

CONNELL, I. et al. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. **Proc. Nat. Acad. Scienc.**, v. 93, n. 18, p. 9827-9832, 1996.

CRAVIOTO, A. et al. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. **Curr. Microbiol.**, v. 3, p. 95–99, 1979.

CROXEN, M. A. et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.,** v. 26, p. 822-880, 2013.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nat. Rev. Microbiol**., v. 8, p. 26–38, 2010.

CZECZULIN, J. R. et al. Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 2692-2699, 1999.

DALE, A. P.; WOODFORD, N. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): Disease, carriage and clones. **J. Infect.**, v. 71, p. 615-626, 2015.

DALLMAN, T. J. et al. An investigation of the diversity of strains of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from cases associated with a large multi-pathogen foodborne outbreak in the UK. **PLoS One**, v. 9, p. 98-103, 2014.

DAUTIN, N. Serine protease autotransporters of enterobacteriaceae (SPATEs): biogenesis and function. **Toxins (Basel).,** v. 2, p. 1179-1206, 2010.

DAWSON, K. G.; EMERSON, J. C.; BURNS, J. L. Fifteen years of experience with bacterial meningitis. **Pediatr. Infect. Dis. J.,** v. 18, p. 816-822, 1999.

DJAFARI, S. et al. Characterization of an exported protease from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 25, p. 771-784, 1997.

DUDLEY, E.G. et al. Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a pheU pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Mol. Microb.**, v. 61, n. 5, p. 1267-1282, 2006.

DUNCAN, J.L. Differential effect of Tamm-Horsfall protein or adherence of *Escherichia coli* to transitional epithelial cells. **J. Infect. Dis.** V. 158, p.1379-1382, 1988.

DUTTA, P.R. et al. Functional comparison of serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 7105-7113, 2002.

DUTTA, S. et al. Heterogenic virulence in a diarrheagenic *Escherichia coli*: evidence for an EPEC expressing heat-labile toxin of ETEC. **Internat. J. Med. Microbiol.**, v. 305, n. 1, p. 47-54, 2015.

ELIAS, W.P. et al. Organization of biogenesis genes for aggregative adherence fimbria II defines a virulence gene cluster in enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 181, n. 6, p. 1779-1785, 1999.

ELIAS, W. P. et al. Combinations of putative virulence markers in typical and variant enteroaggregative *Escherichia coli* strains from children with and without diarrhoea. **Epidemiology & Infection**, v. 129, n. 1, p. 49-55, 2002.

ELLIOTT, S.J. et al. Characterization of the roles of hemolysin and other toxins in enteropathy caused by alpha-hemolytic *Escherichia coli* linked to human diarrhea. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 5, p. 2040-2051, 1998.

ERMERT, L. et al. Induction of severe vascular leakage by low doses of *Escherichia coli* hemolysin in perfused rabbit lungs. **Lab. Invest.: J. Tech. Meth. Pathol.**, v. 66, n. 3, p. 362-369, 1992.

ESLAVA, C. et al. Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.,** v. 66, p. 3155-3163, 1998.

ESTRADA-GARCIA, T. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli*: a pathogen bridging the North and south. **Curr. Trop. Med. Rep.,** v. 1, p. 88-96, 2014.

ESTRADA-GARCIA, T.; NAVARRO-GARCIA, F. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.,** v. 66, p. 281-298, 2012.

FALSETTI, I.N. **Identificação de caracteristicas fenotipicas e genotipicas de *Escherichai coli* enteroagregativa (EAEC) em amostras de *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC)**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia e Microbiologia)- Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Escola Paulista de Medicina - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1998.

FARFAN, M.J.; INMAN, K. G.; NATARO, J.P. The major pilin subunit of the AAF/II fimbriae from enteroaggregative *Escherichia coli* mediates binding to extracellular matrix proteins. **Infect. and Immun.**, v. 76, n. 10, p. 4378-4384, 2008.

FIHN, S. D. Clinical practice. Acute uncomplicated urinary tract infection in women. **N. Engl. J. Med**., v. 349, p. 259–266, 2003.

FISCHER WALKER, C.L. et al. Does childhood diarrhea influence cognition beyond the diarrhea-stunting pathway? **PLoS One**, v 10 p. e47908, 2012.

FLECKENSTEIN, J.M. et al. Molecular mechanisms of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. **Microbes Infect**.;12:89–98, 2010.

FLORES-MIRELES, A.L. et al. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. **Nat. Ver. Microbiol.**, v. 13, n. 5, p. 269, 2015.

FORSYTH, V.S. et al. Rapid growth of uropathogenic *Escherichia coli* during human urinary tract infection. **MBio**, v. 9, n. 2, p. e00186-18, 2018.

GATI, Noble Selasi et al. Origin and evolution of hybrid Shiga toxin-producing and uropathogenic (STEC/UPEC) *Escherichia coli* of sequence type 141. **J. Clin. Microbiol.**, p. JCM. 01309-19, 2019.

GBD (GLOBAL BURDEN OF DIARRHOEAL DISEASES COLLABORATORS). Estimates of global, regional, national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **Lancet. Infect. Dis.**, v. 17, p. 909–948, 2017.

GIOPPO, N.M.R. et al. Prevalence of HEp-2 cell-adherent *Escherichia coli* and characterisation of enteroaggregative *E. coli* and chain-like adherent *E. coli* isolated

from children with and without diarrhoea, in Londrina, Brazil. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 190, n. 2, p. 293-298, 2000.

GOMES, T. A.T.; ABE, C. M.; MARQUES, L. R. Detection of HeLa cell-detaching activity and alpha-hemolysin production in enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from feces of Brazilian children. **J Clin Microbiol**., v. 33, p. 33-64, 1995.

GOMES, T.A.T. et al. Adherence patterns and adherence-related DNA sequences in *Escherichia coli* isolates from children with and without diarrhea in São Paulo city, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 3609-3613, 1998.

GOMES, T.A.T. et al. Adherence patterns and adherence-related DNA sequences in *Escherichia coli* isolates from children with and without diarrhea in São Paulo city, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 3609-3613, 1998.

GOMES, T.A.T. et al. Diarrheagenic *Esherichia coli.* **Braz. J. Microb.**, v.47, p. 3-30, 2016.

GUERRANT, R. L. et al. The impoverished gut- a triple burden of diarrhoea, stunting and chronic disease. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.,** v. 10, p. 220-229, 2013.
GUTIERREZ-JIMENEZ, J.; ARCINIEGA, I.; NAVARRO-GARCIA, F. The serine protease motif of Pic mediates a dose-dependent mucolytic activity after binding to sugar constituents of the mucin substrate. **Microb. Pathog.**, v. 45, p. 115–123, 2008.

GUYER, D. M. et al. Indentification of Sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli.* **Mol. Microbiol.**, v. 38, p. 53-66, 2000.

GUYER, D.M. et al. Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 8, p. 4539-4546, 2002.

HARRINGTON, S. M. et al. Aggregative adherence fimbriae contribute to the inflammatory response of epithelial cells infected with enteroaggregative *Escherichia coli.* **Cell Microbiol.** v. 7, p. 1565–1578, 2005.HARRINGTON, S. M.; DUDLEY, E. G.; NATARO, J. P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 254, p. 12-18, 2006.

HARRINGTON, S.M. et al. The Pic protease of enteroaggregative *Escherichia coli* promotes intestinal colonization and growth in the presence of mucin. **Infect. Immun.**, v. 77, p. 2465-2473, 2009.

HEBBELSTRUP JENSEN, B. et al. Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli.* **Clin. Microbiol. Rev.**,v. 27, p. 614-30, 2014.

HEBBELSTRUP JENSEN, B. et al. Genetic virulence profile of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from Danish children with either acute or persistent diarrhea. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 230, 2017.

HEIMER, S.R. et al. Autotransporter genes pic and tsh are associated with *Escherichia coli* strains that cause acute pyelonephritis and are expressed during urinary tract infection. **Infection and immunity**, v. 72, n. 1, p. 593-597, 2004.

HENDERSON, I. R. et al. P. Characterization of *pic*, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.,** v. 67, p. 5587-5596, 1999.

HENDERSON, I. R. et al. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.,** v. 68, p. 692–744, 2004.

HERNANDES, R.T. et al. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Let.**, v. 297, n. 2, p. 137-149, 2009.

HERZER, P. J. et al. Phylogenetic distribution of branched RNS-linked multicopy single- stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.,** v. 172, p. 6175-6181, 1990.HERZOG, K. et al. Diarrheagenic enteroaggregative *Escherichia coli* causing urinary tract infection and bacteremia leading to sepsis. **Infection.,** v. 42, p. 441-444, 2014.

HULL, S.I. et al. Genetics of hemolysin of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 151, n. 2, p. 1006-1012, 1982.

HULTGREN, S.J. et al. Role of type 1 pili and effects of phase variation on lower urinary tract infections produced by *Escherichia coli*. **Infect. Immun**. v. 50, p. 370-377, 1985.

HUNG, C.S; DODSON, K.W.; HULTGREN, S.J. A murine model of urinary tract infection. **Nat. Prot.**, v. 4, n. 8, p. 1230, 2009.

HVIDBERG, et al. Development of a long-term ascending urinary tract infection mouse model for antibiotic treatment studies. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 1, p. 156-163, 2000.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). **Pesquisa nacional por amostra de domicílios.** v. 31, p. 1-135, 2011.

INGERSON-MAHAD, M.; REID, A. *E. coli*: good, bad & deadly. **American Academy of Microbiology**, p.1-13, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Munic: mais da metade dos municípios brasileiros não tinha plano de saneamento básico em 2017. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/22611-munic-mais-da-metade-dos-municipios-brasileiros-nao-tinha-plano-de-saneamento-basico-em-2017> Acesso em: 09 dez de 2018.

ITOH, Y. et al. Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable :H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, p. 2546-2550, 1997.

JENSEN, K. F. The *Escherichia coli* K-12" wild types" W3110 and MG1655 have an rph frameshift mutation that leads to pyrimidine starvation due to low pyrE expression levels. **J. Bacteriol.**, v. 175, n. 11, p. 3401-3407, 1993.

JOHNSEN, Nanna et al. α-Haemolysin production, as a single factor, causes fulminant sepsis in a model of *Escherichia coli*-induced bacteraemia. **Cell. Microbiol.**, v. 21, n. 6, p. e13017, 2019.

JOHNSON, J.R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clin. Microbiol.**, v. 4, p. 80-125, 1991.

JOHNSON, D.E. et al. Comparison of *Escherichia coli* strains recovered from human cystitis and pyelonephritis infections in transurethrally challenged mice. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 7, p. 3059-3065, 1998.

JOHNSON, J. R. et al. Isolation and molecular characterization of nalidixic acid-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail chicken products. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 47, p. 2161-2168, 2003.

JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. **Int. J. Med. Microbiol.,** v. 295, p. 383-404, 2005.

JØNSSON, R. et al. A novel Aggregative Adherence Fimbriae (AAF/V) of Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC). **Infect. Immun.,** v. 83, p. 1396-1405, 2015.

JØNSSON, R. et al. A novel pAA virulence plasmid encoding toxins and two distinct variants of the fimbriae of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Front. Microbiol.**, v. 8, p. 263, 2017.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli.* **Nat. Rev. Microbiol.,** v. 2, p. 123-140, 2004.

KEUSCH, G. T. et al. Implications of acquired environmental enteric dysfunction for growth and stunting in infants and children living in low- and middle-income countries. **Food. Nutr. Bull.,** v. 34, p. 357-364, 2013.

KHAIRY, Rasha M. et al. Phylogenic classification and virulence genes profiles of uropathogenic *E. coli* and diarrhegenic *E. coli* strains isolated from community acquired infections. **PloS one**, v. 14, n. 9, p. e0222441, 2019.

KLEMM, P.; SCHEMBRI, M.A. Bacterial adhesins: function and structure. **Int. Med. Microbiol.**, v. 290, p. 27-35, 2000.

KOTLOFF, K. L. et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. **Lancet. v.** 382 p. 209-22. 2013.

LARA, F.B., et al. Virulence markers and phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains with hybrid EAEC/UPEC genotypes recovered from sporadic cases of extraintestinal infections. **Front. Microbiol.**, v. 8, p. 146, 2017.

LECOINTRE, G. et al. *Escherichia coli* Molecular Phylogeny Using the Incongruence Length Difference Test. **Mol. Biol. Evol.,** v. 15, p. 1685-1695, 1998.

LEYTON, D. L. et al. Transfer region of pO113 from enterohemorrhagic *Escherichia coli:* similarity with R64 and identification of a novel plasmid-encoded autotransporter, EpeA. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 6307–6319, 2003.

LIMA, I.F. et al. Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* and its virulence-related genes in a case–control study among children from north-eastern Brazil. **J. Medical Microbiol.**, v. 62, n. Pt 5, p. 683, 2013.

LÜTHJE, P.; BRAUNER, A. Virulence factors of uropathogenic *E. coli* and their interaction with the host. In: **Advac. Microb. Physiol.** Academic Press, p. 337-372, 2014.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10 ed. São Paulo: Prentice Hall, p. 608, 2004.

MANGES, A. R.; JOHNSON, J. R. Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. **Clin. Infect. Dis.**, v. 55, p. 712-719, 2012.

MARONCLE, N. M. et al. Protease activity, secretion, cell entry, cytotoxicity, and cellular targets of secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 6124-6134, 2006.

MARRS, C. F.; ZHANG, L.; FOXMAN, B. *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes?. **FEMS microbiol. letters**, v. 252, n. 2, p. 183-190, 2005.

MELENDEZ-AVALOS, A. et al. Analysis of inflammatory cytokine expression in the urinary tract of BALB/c mice infected with Proteus (P.) mirabilis and enteroaggregative Escherichia (E.) coli (EAEC) strains. **F. Microbiol.**, p. 1-10, 2019.

MELLMANN, A. et al. Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104: H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. **PloS one**, v. 6, n. 7, p. e22751, 2011.

MELLIES, J. L. et al. espC pathogenicity island of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes an enterotoxin**. Infect. Immun.**, v. 69, p. 315-324, 2001.

MELTON-CELSA, A.R. Shiga toxin (Stx) classification, structure, and function. **Microbiol Spectr**. 2(3). EHEC-0024-2013,2014.

MOBLEY, H. L. et al. Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains. **Infec. Immun.**, v. 58, n. 5, p. 1281-1289, 1990.

MOBLEY, H.L; DONNENBERG, M.S; HAGAN, E.C. Uropathogenic *Escherichia coli*. **EcoSal Plus**, 2009.

MORENO, A. C. et al. Recognition of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella flexneri* by dendritic cells: distinct dendritic cell activation states. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**., v. 107 p. 138-41. 2012.

MORENO, A. C.; FERREIRA, L. G.; MARTINEZ, M. B. Enteroinvasive *Escherichia coli* vs. *Shigella flexneri*: how different patterns of gene expression affect virulence. **FEMS Microbiol. Lett.,** v. 301, p. 156-163, 2009.

MORIN, N.; SANTIAGO, A.E.; ERNST, R.K.; GUILLOT, S.J.; NATARO, J.P. Characterizationof the AggR regulon in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** V.81, p. 122–132, 2013.

MULVEY, M.A.; SCHILLING, J.D.; HULTGREN, S.J. Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 7, p. 4572-4579, 2001.

MUNHOZ, D.D. et al. Distribution of Major Pilin Subunit Genes Among Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* and Influence of Growth Media on Expression of the ecp Operon. **Front. Microbiol.**, v. 9, p. 942, 2018.

NATARO, J. P. et al. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 6, p. 829-831, 1987.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli.* **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, p.142-201, 1998.

NATARO, J. P.; STEINER, T.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Emerg Infect Dis.**, v. 4, p. 251–261, 1998.

NATARO, J.P. et al. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 2297-2304, 1992.

NATARO, J.P. et al. Heterogeneity of Enteroaggregative *Escherichia coli* Virulence Demonstrated. **J. Infect. Dis.**, v. 171, n. 2, p. 465-468, 1995.

NATARO, J.P., et al*.* Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 6, p. 829-831, 1987.

NAVARRO-GARCIA, F. et al. Pic, an autotransporter protein secreted by different pathogens in the Enterobacteriaceae family, is a potent mucus secretagogue. **Infect. Immun.**, v. 78 p. 4101-4119, 2010.

NAVARRO-GARCIA, F.; ELIAS, W. P. Autotransporters and virulence of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Gut. Microbes**, v. 2, p. 13-24, 2011.

NAVARRO-GARCIA, Fernando. *Escherichia coli* O104: H4 pathogenesis: an enteroaggregative *E. coli*/Shiga toxin-producing *E. coli* explosive cocktail of high virulence. In: **Enterohemorrhagic *Escherichia coli* and Other Shiga Toxin-Producing E. coli**. ASM, p. 533-539, 2015.

NAZEMI, A. et al. Distribution of pathogenic genes *aatA, aap, aggR*, among uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and their linkage with *StbA* Gene. **Indian J. Microbiol.**, v. 51, p. 355–358, 2011.

NORINDER, B. S. et al. Do *Escherichia coli* strains causing acute cystitis have a distinct virulence repertoire?. **Microb. Path.**, v. 52, n. 1, p. 10-16, 2012.

NUNES, K. O. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* with uropathogenic characteristics are present in feces of diarrheic and healthy children. **Pathog. Dis.**, v. 75, n. 8, 2017.

OCHOA, T. J.; CONTRERAS, C. A. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) infection in children. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 24, p. 478-483, 2011.

OKEKE, I.N et al. Multi-locus sequence typing of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from Nigerian children uncovers multiple lineages. **PLoS One**., v. 23, p. e14093, 2010.

OKEKE, I.N. et al. Heterogeneous virulence of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from children in Southwest Nigeria. **J. Infect. Dis.**, v. 181, p. 252-260, 2000.

OKHUYSEN, P.C.; DUPONT, H.L. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): a cause of acute and persistent diarrhea of worldwide importance. **J. Infect. Dis**. , v. 202, n.4, p. 503-505, 2010.

OLESEN, B. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* O78:H10, the cause of an outbreak of urinary tract infection**. J. Clin. Microbiol.,** v. 50, p.3703–3711, 2012.

PARHAM, N. J. et al. PicU, a second serine protease autotransporter of uropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett**., v.15, p. 73-83, 2004.

PARK, H. K. et al. Comparison of *Escherichia coli* uropathogenic genes (*kps*, *usp* and *ireA*) and enteroaggregative genes (*aggR* and *aap*) via multiplex polymerase chain reaction from suprapubic urine specimens of young children with fever. **Scand. J. Urol. Nephrol**., v. 43, p. 51–57, 2009.

PARKKINEN, J.; VIRKOLA, R.; KORHONEN, T.K. Identification of factors in human urine that inhibit the binding of *Escherichia coli* adhesins. **Infect. Immun.**, v.56, p.2623-2630, 1988.

PEREIRA, A.L. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence markers: positive association with distinct clinical characteristics and segregation into 3 enteropathogenic *E. coli* serogroups. **J. Infect. Dis.**, v. 195, p. 366 –374, 2007.

PETRI, W. A. et al. Enteric infections, diarrhea, and their impact on function and development. **J. Clin. Invest.,** v. 118, p. 1277-1290, 2008.

PITOUT, J. D. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance. **Front. Microbiol.**, v. 19, p. 3-9, 2012.

PRATT, L.A.; KOLTER, R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type 1 pili. **Mol. Microbiol**, v. 30, p.285-293, 1998.

PUPO, G. M.; LAN, R.; REEVES, P. R. Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. **Proc. Natl. Acad. Sci.,** v. 97, p. 10567–10572, 2000.

RASKO, David A. et al. Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic–uremic syndrome in Germany. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 8, p. 709-717, 2011.

REGUA-MANGIA, A.H. et al. Molecular characterization of uropathogenic and diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes. **J. Bas. Microbiol**., v. 50, p. 107-115, 2010.

RILEY, L.W. et al. Hemorragic colitis associated with a rare *Escherichia coli serotype*. **N. Engl. J. Med.**, v. 308, p. 681-685, 1983.

RILEY, L.W. Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli.* **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 20, p. 380–390, 2014.

RODRIGUES et al. Clonal structure and virulence factors in strains of *Escherichia coli* of the classic serogroup O55. **Infect. Immun.**, v. 64, n. 7, p. 2680-2686, 1996.

RUIZ-PEREZ, F. et al. Serine protease autotransporters from Shigella flexneri and pathogenic *Escherichia coli* target a broad range of leukocyte glycoproteins. **Proc. Natl. Acad. Sci USA.**,v. 108, p. 12881-12886, 2011.

RUIZ-PEREZ, F.; NATARO, J. P. Bacterial serine proteases secreted by the autotransporter pathway: classification, specificity, and role in virulence. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 71, p. 745-770, 2014.

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **J. Infect. Dis.,** v. 181, p. 1753–1754, 2000.

SABATÉ, M. et al. Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. **Clin. Microbiol. Infect.**,v. 12, p. 880– 886, 2006.

SANDBERG, T. et al. Virulence of *Escherichia coli* in relation to host factors in women with symptomatic urinary tract infection. **J. Clin. Microbiol.**, v. 26, n. 8, p. 1471-1476, 1988.

SARANTUYA, J. et al. Typical enteroaggregative *Escherichia coli* is the most prevalent pathotype among *E. coli* strains causing diarrhea in Mongolian children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p.133-139, 2004.

SCALETSKY, I. C. A. et al. A localized adherence pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells that is associated with infantile diarrhea. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 3410-3415, 1999.

SCALETSKY, I.C.A; SILVA, M.L.M; TRABULSI, L.R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infect. Immun.**, v. 45, p. 534-536, 1984.

SCAVIA, G., et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with a foodborne outbreak of gastroenteritis. **J. Med. Microbiol.**, v. 57, p. 1141-1146, 2008.

SCHAEFFER, A. J., et al. Relationship of type 1 pilus expression in *Escherichia coli* to ascending urinary tract infections in mice. **Infect. Immun.**, v. 55, p. 373-380 ,1987.

SCHEMBRI, M. A.; KLEMM, P. Biofilm formation in a hydrodynamic environment by novel *fimH* variants and ramifications for virulence. **Infect. Immun.**, v.69, p. 1322-1328, 2001.

SCHEMBRI, M.A. et al. Capsule and fimbria interaction in *Klebsiella pneumoniae*. **Infect. Immun**., v. 73, n. 8, p. 4626-4633, 2005.

SCHEMBRI, M.A.; KJÆRGAARD, K.; KLEMM, P. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. **Molec. Microbiol.**, v. 48, n. 1, p. 253-267, 2003.

SCHEUTZ, F. et al. Characteristics of the enteroaggregative Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strain causing the outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, May to June 2011. **E. Surveill.**, v**.** 16, p. 24, 2011.
SCHEUTZ, F. Taxonomy Meets Public Health: The Case of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli.* **Microbiol. Spectr.,** v. 2, p. 1-15, 2014.

SCHEUTZ, F.; STROCKBINE, N. A. Genus I. *Escherichia castellani* and *Chalmers 1919.* Em: GARRITY, G.M. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** The Proteobacteria Part B. v. 2 p. 607-624. 2005.

SHAMIR, E.R. et al. Nitazoxanide inhibits biofilm production and hemagglutination by enteroaggregative *Escherichia coli* strains by blocking assembly of AafA fimbriae. **Antimicr. Ag. Chemother.**, v. 54, n. 4, p. 1526-1533, 2010.

SHEIKH, J. et al. A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Clin. Invest.**, v. 110, n. 9, p. 1329-1337, 2002.

SHEIKH, J. et al. Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli.* **Mol. Microbiol.**, v. 41, p. 983-997, 2001.

SIDOTI, F. et al. Diagnosis of viral gastroenteritis: limits and potential of currently available procedures. **J. Infect. Dev. Ctries**., v. 6, p. 551-561, 2015.

SIITONEN, A. What makes *Escherichia coli* pathogenic?. **Ann. Med**., v.26, p. 229-231,1994.

SITTERLEY, G. Poly-L-Lysine Cell Attachment Protocol. **BioFiles**, v. 3, p. 12, 2008.

SMITH, J. L.; FRATAMICO, P. M.; GUNTHER, N. W. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Foodborne Pathog. Dis**., v. 4, p. 134-163, 2007.

SOTO, S.M., et al. Prevalence of the *set-1B* and *astA* genes encoding enterotoxins in uropathogenic *Escherichia coli* clinical isolates. **Micorb. Pathog.** v. 47, p. 305-307, 2009.

STAPLETON, A.; MOSELEY, S.; STAMM, W. E. Urovirulence determinants in *Escherichia coli* isolates causing first-episode and recurrent cystitis in women. **J. Infect. Dis.**, v. 163, n. 4, p. 773-779, 1991.

STEINER et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* expresses a novel flagellin that causes IL-8 release from intestinal epithelial cells. **J. Clin. Invest.**, v. 105, p. 1769-1777, 2000.

STEPANOVIĆ, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS**, v. 115, p. 891–899, 2007.

STEYERT, S. R. et al. Comparative genomics and stx phage characterization of LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v. 2, p. 133, 2012.

TADDEI, C.R. et al. Prevalence of secreted autotransporter toxin gene among diffusely adhering *Escherichia coli* isolated from stools of children**. FEMS Microbiol. Lett.**, v. 227, p.249 –253, 2005.

TENAILLON, O. et al. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nat. Rev. Microbiol.**,v. 8, p. 207-217, 2010.

TOKUDA, K. et al. Characterization of typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli* in Kagoshima, Japan: biofilm formation and acid resistance. **Microbiol. Immun.**, v. 54, n. 6, p. 320-329, 2010.

TOVAL, Francisco et al. Characterization of *Escherichia coli* isolates from hospital inpatients or outpatients with urinary tract infection. **J. Clin. Microbiol.**, v. 52, n. 2, p. 407-418, 2014a.

TOVAL, F. et al. Characterization of urinary tract infection-associated Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 82, n. 11, p. 4631-4642, 2014b.

TRABULSI, L.R.; KELLER R.; GOMES, T.A.T. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerg. Infect. Dis.**, v.8, n.5, p. 508-513, 2002.

UNHANAND, M. et al.Gram-negative enteric bacillary meningitis: a twenty-one-year experience. **J. Pediatr.,** v. 122, p. 15-21, 1993.

VEJBORG, R. M. et al. Comparative genomics of *Escherichia coli* strains causing urinary tract infections. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 77, n. 10, p. 3268-3278, 2011.

VISWANATHAN, V.K.; HODGES, K.; HECHT, G. Enteric infection meets intestinal function: how bacterial pathogens cause diarrhea. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 7, p. 110-119, 2008.

WAKIMOTO, N. et al. Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 71, n. 5, p. 687-690, 2004.

WALLACE-GADSDEN, F. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* related to uropathogenic clonal group A. **Emerg. Infect. Dis.**,v. 13, p. 757-760, 2007.

WANG, A. et al. Urinary tract infections. **Prim. Care.,** v. 40, p.687-706, 2013.

WANKE, C.A. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* as a potential cause of diarrheal disease in adults infected with human immunodeficiency virus. **J. Infect. Dis.**, v. 178, n. 1, p. 185-190, 1998.

WEI, J. et al. Complete genome sequence and comparative genomics of *Shigella flexneri* serotype 2a strain 2457T. **Infect. Immun.** v. 71, p. 2775–2786, 2003.

WELCH, R. A. Pore-forming cytolysins of Gram-negative bacteria. **Molec. Microbiol.**, v. 5, n. 3, p. 521-528, 1991.

WELCH, R. A. et al. The synthesis and function of the *Escherichia coli* hemolysin and related RTX exotoxins. **FEMS Microbiol. Immun.**, v. 5, n. 1-3, p. 29-36, 1992.

WHITTAM, T. S.; OCHMAN, H.; SELANDER, R. K. Geographic Components of Linkage Disequilibrium in Natural Populations of *Escherichia coli*. **Mol. Biol. Evol.,** v.1, p. 67-83, 1983.

WHO (WORLD HEATH ORGANIZATION) disponível em: <https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/> Acesso em: 09 ago. de 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diarrhoeal disease**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/>. Acesso em: 09 ago. de 2019.